

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 3430683 A1

21 Aktenzeichen: P 34 30 683.8
22 Anmeldetag: 21. 8. 84
43 Offenlegungstag: 6. 3. 86

51 Int. Cl. 4:
C 12 N 15/00
C 12 R 1/19
C 12 N 1/20
C 12 P 21/00
C 07 K 1/00

1 Anmelder:
Hoechst AG, 6230 Frankfurt, DE

72 Erfinder:
Engels, Joachim, Dr., 6242 Kronberg, DE; Uhlmann,
Eugen, Dr., 6240 Königstein, DE; Leineweber,
Michael, Dr., 6230 Frankfurt, DE

54 Synthetische Regulationsregion

Eine synthetische Regulationsregion auf der Basis eines modifizierten lac-Operators erlaubt eine effiziente Expression heterologer Gene in E. coli. Die einzelnen Bausteine lassen sich durch andere Elemente wie Promotoren, Operatoren, ribosomale Erkennungsstellen oder Spacer-Gruppierungen ersetzen und erlauben vielseitige Kombinationen.

DE 3430683 A1

PATENTANSPRÜCHE:

1. Synthetische Regulationsregion für die Expression
heterologer Gene in E. coli, enthaltend einen Promotor,
einen modifizierten lac-Operator und eine ribosomale
Bindungsstelle, gekennzeichnet durch eines oder mehrere
5 der folgenden Merkmale:
- a) die -35-Region im Promotor hat die Nucleotid-
Sequenz (codierender Strang)
TTGACA,
10
- b) die -10-Region im Promotor hat die Nucleotid-Sequenz
(codierender Strang)
TATAAT,
15
- c) zwischen der -35- und -10-Region ist eine Spacer-
Gruppierung von 16 bis 19 Basenpaaren und
- d) zwischen der ribosomalen Bindungsstelle und dem
ATG-Startcodon ist eine Spacer-Gruppierung von 6 bis
20 14 Basenpaaren angeordnet.
2. Regulationsregion nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
net, daß die -35-Region die Sequenz
TTGACAT
25
- hat.
3. Regulationsregion nach Anspruch 1 oder 2, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die -10-Region die Sequenz
30 GTATAAT
- hat.
4. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorher-
35 gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die

- 15 -
- 2 -

-35-Region die Sequenz
CTTGACAT
hat.

- 5 5. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Spacer-Gruppierung zwischen der -35 und der -10-Region 17 Basenpaare aufweist.
- 10 6. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Spacer-Gruppierung zwischen der -35 und der -10-Region A,T-reich ist.
- 15 7. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Spacer-Gruppierung zwischen der ribosomalen Bindungsstelle und dem Startcodon 10 Basenpaare aufweist.
- 20 8. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Spacer-Gruppierung zwischen der ribosomalen Bindungsstelle und dem Startcodon A,T-reich ist.
- 25 9. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ribosomale Bindungsstelle purinreich ist.
- 30 10. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der modifizierte lac-Operator die DNA-Sequenz I (Anhang) aufweist.
- 35 11. Regulationsregion nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß

der modifizierte lac-Operator die DNA-Sequenz IIa (Anhang) aufweist.

- 5 12. Genstruktur, enthaltend eine Regulationsregion nach Anspruch 1 bis 11.
13. Hybridvector, enthaltend eine Genstruktur nach Anspruch 12.
- 10 14. E. coli, enthaltend einen Hybridvector nach Anspruch 13.
15. Polypeptid, exprimiert von E. coli nach Anspruch 14.
-

Synthetische Regulationsregion

Bei der gentechnischen Herstellung eukaryotischer Polypeptide in Bakterien, insbesondere E.coli, wird das "heterologe" Gen, welches für das gewünschte eukaryotische Polypeptid codiert, in einen geeigneten Vektor eingebaut und dieser Hybridvektor dann in den bakteriellen Wirt eingebracht. Es müssen jedoch eine Reihe von Voraussetzungen vorliegen, damit dieses heterologe Gen die Produktion des gewünschten Polypeptids bewirken kann. Eine wesentliche Voraussetzung ist eine funktionierende Regulationsregion, bestehend aus einem Operator, einem Promotor und einer sogenannten "Shine-Dalgarno-Sequenz", auch SD-Sequenz oder, vereinfachend (da an das Ribosom erst die entsprechende Sequenz der mRNA bindet) im folgenden "ribosomale Bindungsstelle" genannt.

Die richtige Expression des Gens, also die Produktion des gewünschten Polypeptids, setzt ein Erkennen des Promotors durch den bakteriellen Wirt voraus. Das wirtseigene Enzym RNA-Polymerase erkennt eine Teilsequenz in der DNA des Promotors und bindet an diese Teilsequenz. Hierdurch wird eine Öffnung der doppelsträngigen DNA in dieser Region bewirkt, worauf die Synthese der mRNA am codierenden Strang (Transkriptionsstrang) beginnt.

Der Operator, der häufig mit dem Promotor überlappt, wird durch ein wirtseigenes Repressor-Protein erkannt. Durch die mehr oder weniger wirksame Bindung dieses Repressor-Proteins an den Operator wird die Transkriptionshäufigkeit reguliert. Dieses System wird durch Induktoren (Inducer-Moleküle) beeinflusst, die das Repressor-Protein binden und so den Operator aktivieren.

Die ribosomale Bindungsstelle ist schließlich dafür verantwortlich, daß der zunächst synthetisierte Teil der mRNA

eine RNA-Sequenz für die Bindung an das Ribosom erhält, an dem die Translation, also die "Übersetzung" in das Polypeptid, stattfindet.

- 5 Die Regulationsregion ist somit zuständig für die Expression des Gens in das gewünschte Polypeptid über die Stufe der Transkription (Umschreibung der DNA in mRNA) und die anschließende Translation. Wichtig für den Aufbau einer solchen Regulationsregion ist außer der Folge der Nucleotide die Geometrie, also die räumliche Zuordnung von
- 10 Promotor, Operator und ribosomaler Bindungsstelle.

Im folgenden bezieht sich die Numerierung der Nukleotide auf die Stelle des Transkriptionsstartes (Null), wobei wie

15 üblich von 5'- in 3'-Richtung gezählt wird.

- Natürliche Promotoren für die E. coli-RNA-Polymerase zeigen zwei Regionen konservierter DNA-Sequenzen. Es ist dies zum einen die -35-Region und andererseits die -10-Region, auch
- 20 "Pribnow-Schaller-Box" genannt, wobei sich die Bezifferung auf die genannte Nucleotid-Numerierung bezieht, d.h. daß diese Regionen vor dem Transkriptionsstart angeordnet sind.

- 25 Die erfindungsgemäße Regulationssequenz stellt eine Modifikation der natürlichen Regulationssequenzen dar, die eine optimale Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor und eine effektive Nutzung des Operators gewährleistet. Die erfindungsgemäße Regulationssequenz kann entweder
- 30 direkt vor das heterologe Gen gesetzt werden, worauf das gewünschte Polypeptid (mit Methionin am Aminoterminus) exprimiert wird, oder es wird ein Bakteriengen - ganz oder teilweise - vor das heterologe Gen geschaltet, wodurch ein Fusionsprotein exprimiert wird, wobei ein Bakterienprotein-
- 35 Anteil an den Aminoterminus des gewünschten Polypeptids gebunden ist.

- 3 -

- 6 -

Die erfindungsgemäße synthetische Regulationsregion für die Expression heterologer Gene in E. coli, enthaltend einen Promotor, einen modifizierten lac-Operator und eine ribosomale Bindungsstelle, ist gekennzeichnet durch
5 eines oder mehrere der folgenden Merkmale:

a) die -35-Region im Promotor hat die Nucleotid-Sequenz
(codierender Strang)
TTGACA,

10

b) die -10-Region im Promotor hat die Nucleotid-Sequenz
(codierender Strang)
TATAAT,

15

c) zwischen der -35- und der -10-Region ist eine Spacer-Gruppierung von 16 bis 19 Basenpaaren und

20

d) zwischen der ribosomalen Bindungsstelle und dem ATG-Startcodon ist eine Spacer-Gruppierung von 6 bis 14 Basenpaaren angeordnet.

Weitere Ausgestaltungen dieser Erfindung sind in den Patentansprüchen niedergelegt.

25 Neben den bereits genannten Vorteilen zeichnet sich die erfindungsgemäße Regulationsregion dadurch aus, daß sie sehr variabel ist und aufgrund einer Reihe singulärer Restriktionsschnittstellen die einzelnen Elemente, nämlich Promotor, Operator und ribosomale Bindungsstelle, sich her-
30 ausschneiden und mit bekannten Systemen kombinieren lassen. Weiterhin kann durch Modifikation der Spacer-Gruppierungen die Geometrie variiert und an die Gegebenheiten des Einzelfalles noch besser angepaßt werden.

35 Die Konstruktion der erfindungsgemäßen Regulationsregion

erfolgt vorzugsweise vollsynthetisch. Hierfür können die bekannten DNA-Synthesemethoden eingesetzt werden, beispielsweise die Phosphitmethode.

- 5 Die DNA-Sequenz I (Anhang) zeigt eine vorteilhafte Ausgestaltung der gesamten Regulationsregion. Die DNA-Sequenzen II a bis II h zeigen spezifische, bevorzugte Ausgestaltungen der Sequenz I. Zur Synthese der Sequenzen I bzw. II werden am 5'- und 3'-Ende jeweils noch einige Nucleotidpaare angefügt, die den Angriff von Restriktionsenzymen zum "Zurechtschneiden" erlauben. Die DNA-Sequenz IIa ist zusätzlich vollständig aufgeführt, wobei am 5'- und 3'-Ende je drei Nucleotidpaare angesetzt sind. Selbstverständlich könnten hier auch andere bzw. mehrere Nucleotidpaare angefügt werden.

- 15 In den folgenden Beispielen werden spezielle Ausgestaltungen der Erfindung im einzelnen erläutert, woraus sich die Vielzahl der möglichen Abwandlungen und Kombinationen für den Fachmann ergibt. Prozentangaben beziehen sich hierbei auf das Gewicht, wenn nichts anderes angegeben ist.

Beispiel 1

25

Synthese der DNA-Sequenz IIa

- a) Chemische Synthese eines einzelsträngigen Oligonucleotids

30

- Am Beispiel des Genbausteins Ia, der die Nucleotide 1-19 (und zusätzlich drei weitere am 5'-Ende zur Ermöglichung des Angriffs von Bam HI) des codierenden Strangs umfaßt, wird die Synthese der Genbausteine erläutert. Nach bekannten Methoden (M.J.Gait et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980)

35

1081-1096) wird das am 3'-Ende stehende Nucleosid, im vor-
liegenden Falle also Thymidin (Nucleotid Nr. 19), an Kiesel-
gel (^(R)FRACTOSIL, Firma Merck) über die 3'-Hydroxyfunktion
covalent gebunden. Hierzu wird zunächst das Kieselgel unter
5 Abspaltung von Ethanol mit 3-(Triethoxysilyl)-propylamin
umgesetzt, wobei eine Si-O-Si-Bindung entsteht. Das Thymidin
wird in Gegenwart von Paranitrophenol und N,N'-Dicyclo-
hexylcarbodiimid mit dem modifizierten Träger umgesetzt,
wobei die freie Carboxygruppe der Succinoylgruppe den
10 Aminorest der Propylaminogruppe acyliert.

In den folgenden Syntheseschritten wird die Basenkompo-
nente als 5'-O-Dimethoxytrityl-nucleosid-3'-phosphorig-
säuremonomethylester-dialkylamid oder -chlorid eingesetzt,
15 wobei das Adenin als N⁶-Benzoyl-Verbindung, das Cytosin
als N⁴-Benzoyl-Verbindung, das Guanin als N²-Isobutyryl-
Verbindung und das keine Aminogruppe enthaltende Thymin
ohne Schutzgruppe vorliegen.

20 100 mg des polymeren Trägers, der 4 µmol Thymidin gebunden
enthält, werden nacheinander mit den folgenden Agentien
behandelt:

- a) Nitromethan
- 25 b) gesättigte Zinkbromidlösung in Nitromethan mit 1 %
Wasser
- c) Methanol
- d) Tetrahydrofuran
- e) Acetonitril
- 30 f) 80 µmol des entsprechenden Nucleosidphosphits und 400
µmol Tetrazol in 1 ml wasserfreiem Acetonitril (5
Minuten)
- g) 20 % Acetanhydrid in Tetrahydrofuran mit 40 % Lutidin
und 10 % Dimethylaminopyridin (2 Minuten)
- 35 h) Tetrahydrofuran

- 8 - - 9 -

- i) Tetrahydrofuran mit 20 % Wasser und 40 % Lutidin
- j) 3 % Jod in Kollidin/Wasser/Tetrahydrofuran im
Volumenverhältnis 5:4:1
- k) Tetrahydrofuran und
- 5 l) Methanol

Unter "Phosphit" wird hierbei der Desoxyribose-3'-mono-phosphorigsäure-monomethylester verstanden, wobei die dritte Valenz durch Chlor oder eine tertiäre Amino-

10 gruppe, beispielsweise einen Morpholinorest, abgesättigt ist. Die Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte können jeweils nach der Detritylierungsreaktion (b) spektrophotometrisch durch Messung der Absorption des Dimethoxytritylkations bei einer Wellenlänge von 496 nm bestimmt werden.

15 Nach abgeschlossener Synthese des Oligonucleotids werden die Methylphosphatschutzgruppen des Oligomers mit Hilfe von p-Thiokresol und Triethylamin abgespalten. Anschließend wird durch 3-stündige Behandlung mit Ammoniak das Oligo-

20 nucleotid vom festen Träger abgetrennt. Eine 2- bis 3-tägige Behandlung der Oligomeren mit konzentriertem Ammoniak spaltet die Aminoschutzgruppen der Basen quantitativ ab. Das so erhaltene Rohprodukt wird durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder durch

25 Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt.

Ganz entsprechend werden auch die übrigen Genbausteine Ib-Ih synthetisiert, deren Nucleotidfolge aus der DNA-Sequenz I Ia hervorgeht.

30 b) Enzymatische Verknüpfung der einzelsträngigen Oligonucleotide

Zur Phosphorylierung der Oligonucleotide am 5'-Terminus

35 werden je 1,0 nmol der Oligonucleotide Ib und Ic unter Zu-

5 satz von 10 nmol Adenosintriphosphat mit 6 Einheiten T4-Polynucleotidkinase in 20 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 10 mM Magnesiumchlorid und 10 mM Dithiothreitol (DTT) 30 Minuten bei 37°C behandelt (C.C. Richardson, Progress in Nucl. Acid Res. 2 (1972) 825). Das Enzym wird durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C desaktiviert.

Analog werden die Oligonucleotide If und Ig phosphoryliert.

10 Die Oligonucleotide Ia und Id und die phosphorylierten Oligonucleotide Ib und Ic werden in 40 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer 5 Minuten auf 95°C erhitzt, worauf man sie langsam auf Raumtemperatur abkühlen läßt. Hierzu fügt man 20 mM Magnesiumchlorid, 10 mM DTT und 1 mM ATP und läßt mit 100
15 Einheiten T4-DNA-Ligase bei 25°C 16 Stunden lang reagieren.

Analog werden die Fragmente Ie und Ih mit den phosphorylierten Fragmenten If und Ig verknüpft.

20 Das Produkt der Ligasereaktion der Oligonucleotide Ia bis Id (Genfragment A) wird gefriergetrocknet und in 100 µl einer Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 6mM Magnesiumchlorid), die 200 Einheiten der Endonuclease
25 Bam HI enthält, bei 37°C 3 Stunden inkubiert.

Das Produkt der Ligasereaktion der Oligonucleotide Ie bis Ih (Genfragment B) wird gefriergetrocknet und in 100 µl einer Pufferlösung (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM Magnesiumchlorid), die 200 Einheiten der
30 Endonuclease Eco RI enthält, bei 37°C 3 Stunden inkubiert. Nach dem Stoppen der Enzymverdauung durch 2minütiges Erhitzen auf 95°C werden die geschnittenen Genfragmente A und B durch Gelelektrophorese auf 15 %igem Polyacrylamidgel
35 (ohne Harnstoffzusatz, 20 x 40 cm, 2 mm Dicke), gereinigt,

wobei als Markersubstanz pBR 322 (Fa. Biolabs), geschnitten mit Hae III, dient. Nach Extraktion der DNA-Banden und Reinigung über ^(R)Sephadex G50 und Sep Pak (Fa. Waters) werden die Genfragmente A und B durch "blunt end ligation"

5 verknüpft. Man erhält so eine synthetische Regulationsregion entsprechend der DNA-Sequenz IIa, die am 5'-Ende des codierenden Strangs eine Verlängerung für den Angriff von Bam HI und am 3'-Ende des codierenden Strangs eine Verlängerung für den Angriff von Eco RI aufweist.

10

Beispiel 2:

Hybridplasmide, die die synthetische Kontrollregion enthalten

15

a) Einbau der Kontrollregion in pUC 8

Das handelsübliche Plasmid pUC 8 wird in bekannter Weise mit den Restriktionsendonucleasen Eco RI und Bam HI geöffnet und über 1%ige niedrigschmelzende Agarose-Gele von den herausgeschnittenen Oligonucleotiden abgetrennt. Die Wiedergewinnung des geschnittenen Plasmids erfolgt nach Auflösen des Gels bei erhöhter Temperatur nach Maßgabe der Hersteller. 1 µg des so geöffneten pUC 8-Plasmids werden

20 mit 10 µg der synthetischen Kontrollregion mittels T4 DNA-Ligase bei 14°C über Nacht ligiert. Man erhält so ein modifiziertes pUC 8-Plasmid mit der integrierten Kontrollregion. Dieses Hybridplasmid ist in der Figur 1 dargestellt, in der die Kontrollregion als SIP bezeichnet ist,

25 was für "synthetischer idealisierter Promotor" steht.

30

b) Transformation

Der Stamm E. coli K 12 wird durch Behandeln mit einer 70 mM Calciumchloridlösung kompetent gemacht und mit der

35

- Suspension des Hybridplasmides in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5), der 70 mM an Calciumchlorid ist, versetzt. Die transformierten Stämme werden auf Ampicillinresistenz selektiert und die inserierte Sequenz durch Sequenzierung nach Maxam-Gilbert verifiziert (A. Maxam und W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564 (1977)).

Beispiel 3:

- 10 Expressionsplasmide, die die synthetische Kontrollregion enthalten

Das handelsübliche Plasmid pBR 322 wird mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Sal I geöffnet und wie oben beschrieben über ein 1 %iges Agarose-Gel gereinigt. Die synthetische Kontrollregion wird aus dem modifizierten pUC 8-Derivat durch Schneiden mit den Enzymen Eco RI und Bam HI rcisoliert, auf 10 %igen Polyacrylamidgelen gereinigt und durch anschließende Elektroelution wiedergewonnen. In analoger Weise wird das γ -Interferongen aus entsprechenden Hybridplasmiden durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I und Reinigen über ein 2%iges Gel aus niedrigschmelzender Agarose isoliert. Als Hybridplasmid, das das γ -Interferongen enthält, wird das Plasmid pMX 2 eingesetzt, dessen Herstellung in der Deutschen Patentanmeldung P 34 09 966.2 beschrieben ist. Es kann jedoch auch das in der Europäischen Patentanmeldung O 095 350 beschriebene Plasmid eingesetzt werden.

- 30 Das linearisierte Plasmid pBR 322, die synthetische Kontrollregionen und das γ -Interferongen werden dann in bekannter Weise ligiert, wobei das Plasmid gemäß Figur 2 erhalten wird .

Beispiel 4:

Aktivitätsvergleich der synthetischen Kontrollregion
mit der bekannten starken Kontrollregion tac

5

Das literaturbekannte Plasmid pKK 177.3 (E. Amann et al.,
Gene 25, 167 (1983)) wird mit den Restriktionsenzymen
Eco RI und Sal I wie oben beschrieben geschnitten und das
 γ -Interferongen eingebaut, wodurch dieses an die tac-
10 Kontrollregion gekoppelt wird. Man erhält das Plasmid gemäß
Figur 3.

Zur Entfernung der tac-Kontrollregion aus pKK 177.3
wird dieses mit Bam HI und Sal I verdaut. Das so lineari-
15 sierte Plasmid wird wie oben beschrieben mit dem
 γ -Interferongen und der synthetischen Kontrollregion
ligiert. Man erhält das Hybridplasmid gemäß Figur 4.

Die Hybridplasmeide gemäß Figur 3 und Figur 4 werden in E.
20 coli K 12 transformiert und die Bakterien in 2 YT-Medium
(Miller, Experiments in Molecular Genetic; 1972) angezogen,
bis eine optische Dichte von 1 bei 578 nm in der Schüttel-
kultur erreicht ist. Zu einem Teil der Bakterienkultur wird
0,1 mM IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid) zugesetzt
25 und hierdurch die Synthese von γ -Interferon 2 Stunden lang
induziert.

Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert und
durch Behandlung mit Lysozym, EDTA und Ultraschall aufge-
30 schlossen (Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring
Harbor, 1982). Die Interferontiter der Bakterienlysate wer-
den mit einem käuflichen Radioimmunoassay (Celltech) wie
folgt ermittelt:

Plasmid gemäß Figur 3: 1×10^5 Einheiten pro ml
Plasmid gemäß Figur 4: $1,5 \times 10^5$ Einheiten pro ml.

5 Im Vergleich zu der bekanntermaßen exzellenten tac-Region
wird somit mit der erfindungsgemäßen Kontrollregion eine
um 50 % höhere γ -Interferon-Ausbeute erhalten.

- 12 -

DNA-Sequenz I (codierender Strang):

5' GGATCCCTAAATAAATTCTTGACATTTTAA2TAATTTGGTATAATGT3T

. 4GAATTG5GAGCG6T7ACAAATT8C9C10G11G12T13TA14TT15 (ATG) 3'

1 = T oder G	7 = A oder C	11 = AG oder GA
2 = A oder C	8 = T oder direkte Bindung	12 = A oder G
3 = G oder C	9 = A oder TAGA	13 = C oder T
4 = G oder A	10 = A, TTTAAA, AAGCTT	14 = GAA oder AGC
5 = T oder C	oder AAGCTA	15 = C oder direkte Bindung
6 = C, GA oder GAA		

DNA-Sequenzen Iia-h:

Iia	1	2	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	3 = G
b	T	A	T	GAA	A	T	A	AG	A	C	GAA	C	4 = G
c	T	A	T	GAA	A	T	TTTAAA	AG	A	C	GAA	C	9 = A
d	G	C	T	GAA	A	T	TTTAAA	AG	A	C	GAA	C	
e	G	C	T	GAA	A	-	AAGCTT	AG	A	C	GAA	C	
f	G	C	T	GAA	A	-	AAGCTT	AG	A	C	GAA	C	
g	G	C	T	C	C	-	AAGCTT	AG	A	C	GAA	C	
h	G	C	T	GA	C	-	AAGCTT	AG	A	C	GAA	C	
	G	C	T	GA	C	-	AAGCTA	GA	G	T	AGC	-	

Bam HI

Ia

10

20

5' A G C G G A T C C T A A A T A A A T T C T T G A C A T
3' T C G C C T A G G A T T T A T T T A A G A A C T G T A

Ib

- Ic

30

40

5' T T T T T A A A T A A T T T G G T A T A A T G T
3' A A A A A T T T A T T A A A C C A T A T T A C A

3' A A A A A T T T A T T A A A C C A T A T T A C A

Ib

Id

————— Ie ————— Ig —————

Ie

4-18

50

60

70

5' G T G G A A T T G T G A G C G G A A T A A C A A T T T
3' C A C C T T A A C A C T C G C C T T A T T C T T A A A

3' C A C C T T A A C A C T C G C C T T A T T C T T A A A

If

Eco RI

 $I_{\mathcal{E}}$

80

90

5' C A C A G A G G A T C T A G A A T T C A C T
5' G T G T C T C C T A G A T C T T A A G T G A

5' G T G T C T C C T A G A T C T T A A G T G A

-Ih

Nummer:
Int. Cl.⁴:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

34 30 683
C 12 N 15/00
21. August 1984
6. März 1986

FIG.1

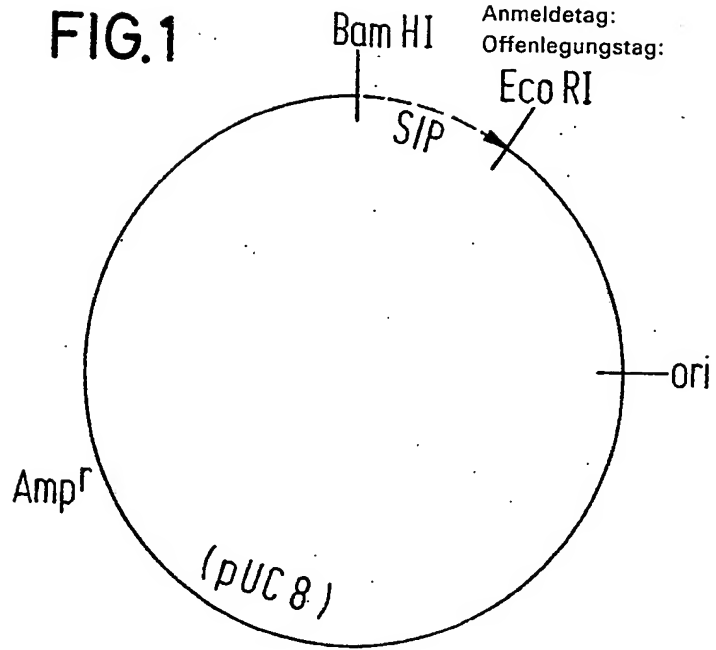


FIG.2

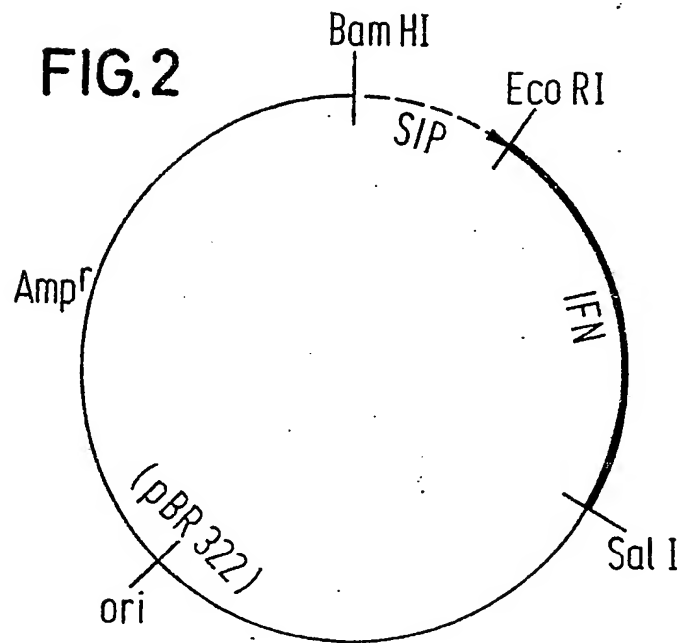


FIG.3

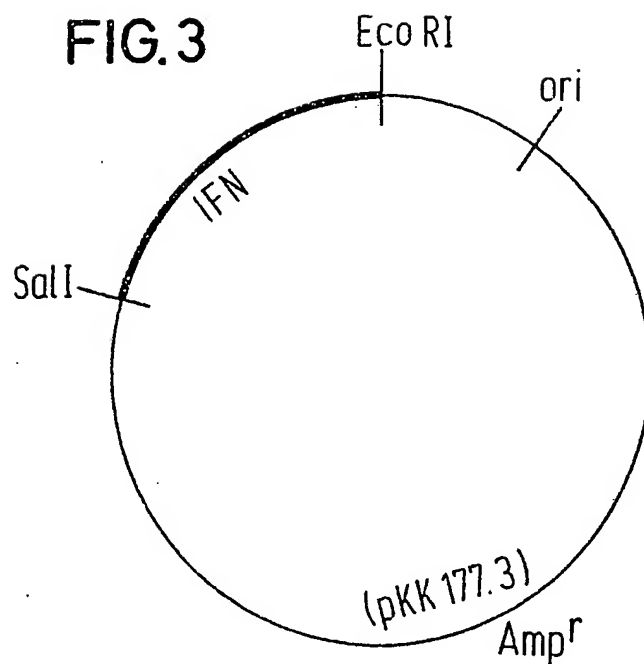
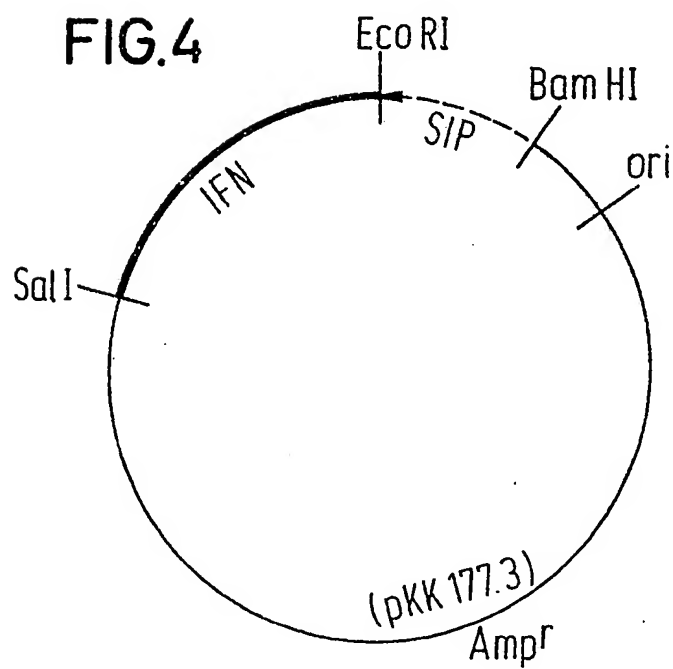


FIG.4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.